

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PC1/JP97/02859

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

12.09.97 4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 1996年 8月19日

REC'D	31 OCT 1997
WIPO	PCT

出 願 番 号
Application Number: 平成 8年特許願第235928号

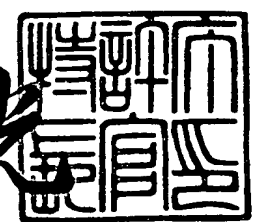
出 願 人
Applicant (s): 雪印乳業株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1997年10月17日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP96311

【提出日】 平成 8年 8月19日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【発明の名称】 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4

【氏名】 中川 信明

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46

【氏名】 保田 尚孝

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12

【氏名】 森永 伴法

【特許出願人】

【識別番号】 000006699

【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

【代表者】 片山 純男

【代理人】

【識別番号】 100090941

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤野 清也

【電話番号】 3226-6671

【代理人】

【識別番号】 100105061

【弁理士】

【氏名又は名称】 児玉 喜博

特平 8-235928

【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 原寄託についての受託書 1

【包括委任状番号】 9406430

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNA。

【請求項2】 配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造することを特徴とする。次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質の製造法。

(a) 分子量 (SDS-PAGEによる);

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性;

(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性（以下、破骨細胞形成抑制活性という）を有する蛋白質を製造する方法に関する。詳しくは、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びこのゲノムDNAを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

【0003】

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー(fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987)、インシュリン様増殖因子-I(insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA(Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン(Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー(bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682,

1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutsen R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993)等のサイトカインが報告されている。

【0004】

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988)やインターロイキン-4 (interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993)等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992)、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン - γ (interferon- γ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986) 等が報告されている。

【0005】

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。又、現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索の結果、既にヒト胎児肺線維芽

細胞 I M R - 90 (ATCC寄託-受託番号 CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFを見出している (PCT/JP96/00374号)。この破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFの由来について、さらに鋭意探索したところ、ヒト由来OCIFのゲノムDNAの塩基配列を決定するに至った。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的的手法により該蛋白質を製造する方法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。本発明のDNAは、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含む。

また、本発明は、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

(a) 分子量(SDS-PAGEによる)；

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列；

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性；

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性；

(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制

活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNAは、ヒト胎盤ゲノムDNAとコスミドベクターを用いてコスミドライブラリーを作製し、このライブラリーをOCIF cDNAをもとに作製したDNA断片をプローブとしてスクリーニングすることにより得られる。このようにして得られたゲノムDNAを適当な発現ベクターに挿入してOCIF発現コスミドを作製し、常法により各種の細胞及び菌株などの宿主にトランスフェクトして発現させることにより、組み換え型OCIFを製造することができる。得られた破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質（破骨細胞形成抑制因子）は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

【0009】

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示する

のみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

【0010】

【実施例1】

コスミドライブラリーの作製

ヒト胎盤ゲノムDNA(クローンテック社; Cat.No.6550-2)とpWE15 コスミドベクター(ストラタジーン社)を用いてコスミドライブラリーを作製した。基本的には、ストラタジーン社のpWE15 コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って実施したが、DNA、大腸菌、ファージを扱う一般的方法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory(1989))を参考に従った。

【0011】

(i) ヒト・ゲノムDNA 制限酵素分解物の調製

1.5mlのエッペンドルフチューブ4本(チューブA、B、C、D)に10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100mM NaClを含む溶液 750 μ l に溶かしたヒト胎盤ゲノムDNAをそれぞれ 100 μ g 入れ、チューブAには0.2ユニット、チューブBには0.4ユニット、チューブCには0.6ユニット、チューブDには0.8ユニットの制限酵素MboIを添加して1時間消化した。その後、それぞれのチューブに20mMになるようにEDTAを添加して反応を止め、フェノール/クロロホルム(1:1)で抽出し、水相に2倍量のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。遠心分離でDNAを回収したあと、70%エタノールで洗い、それぞれのチューブの中のDNAを100 μ lのTEに溶解した。4本のチューブのDNAを1本にまとめ、68℃にて10分保温したのち室温に戻し、これを遠心管(38 ml)の中で作製した10%-40%直線状シヨ糖密度勾配に重層した。シヨ糖密度勾配は20mM Tris-HCl(pH8.0)、5mM EDTA、1M NaClを含む緩衝液のなかで作製した。この遠心管を日立製作所SRP28SAローターを用いて20℃で26,000rpmにて24時間遠心したのち、フラクションコレクターを用いてシヨ糖密度勾配を0.4ml ずつのフラクションに分画した。各フラクションの一部を0.4%アガロース電気泳動にかけてDNAのサイズを確認したのち、およそ30kb(キロベースペア)から40kbの長さのDNAを含むフラクションを集め、糖濃度を10%以下になるようTEで希釈したのちエタノールを2.5倍量加えてDN

A を沈殿させた。DNA は TE (10mM HCl(pH8.0)+1mM EDTA緩衝液 (以下 TE という))に溶解したのち4℃で保存した。

【0012】

(ii)コスミド・ベクターの準備

ストラタジーン社の pWE15コスミドベクターをコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って制限酵素BamHI によって完全消化したのち、エタノール沈殿によってDNA を回収し、1mg/mlの濃度になるようTEに溶解した。このDNA の5' 末端のリン酸を子牛小腸アルカリ性フォスファターゼを用いて除いた後、フェノール抽出とエタノール沈殿によってDNA を回収し、1mg/mlの濃度になるようTEに溶解した。

【0013】

(iii) ゲノムDNA のベクターへのライゲーション及びin vitroパッケージング

1.5 μ g のサイズ分画したゲノムDNA と3 μ g の制限酵素 BamHIで消化したpWE15 コスミドベクターをファルマシア社のReady-To-Go T4DNA ライゲースを用いて20 μ l の反応溶液中でライゲーションした。ライゲーションしたDNA を、ギガバックIIパッケージングエクストラクト (ストラタジーン社)を用い、プロトコールに従ってin vitroパッケージングした。パッケージング反応後、反応液の一部をSM緩衝液で段階的に希釈し、10mM MgCl₂に懸濁した大腸菌XL1-Blue MR(ストラタジーン社)と混合してファージを感染させたのち、50 μ g/mlのアンピシリンを含むLBアガープレートに蒔き、生ずるコロニーの数を計数した。この結果を基にパッケージング反応液1 μ l 当たりのコロニー数を算出した。

【0014】

(iv)コスミドライブラリーの作製

上記の方法で作製したパッケージング反応液と大腸菌XL1-Blue MR を混合し、直径15cmのアガロースプレート当たり50,000個のコロニーが生ずるようにアンピシリンを含むアガロースプレートに蒔いた。一夜37℃でプレートを保温したのち、プレート一枚当たり3ml のLB培地を加えて大腸菌のコロニーを懸濁し、回収した。アガロースプレートをさらに3ml のLB培地で1 回洗い、これを基の大腸菌懸濁液と合わせた。すべてのアガロースプレートから回収した大腸菌を一本の遠心

管にまとめ、グリセロールを20%となるように添加し、さらにアンピシリンを50 $\mu\text{g/ml}$ となるように加えた。十分混合したのち一部を分取し、残りを -80°C に保存した。分取した大腸菌を段階希釈してアガープレートに蒔き、1ml 当たりのコロニー数を算出した。

【0015】

【実施例2】

コスミドライブラリーのスクリーニングとコロニーの純化

50 $\mu\text{g/ml}$ のアンピシリンを含む直径15cmのLBアガロスプレートに直径14.2cmのニトロセルロースフィルター（ミリポア社）を乗せ、その上にプレート一枚当たり50,000個の大腸菌コロニーが生ずるようにコスミドライブラリーを蒔き、 37°C にて一夜保温した。常法に従ってニトロセルロースフィルター上の大腸菌を別のニトロセルロースフィルターに転写してレプリカフィルターを2枚作製した。コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従い、レプリカフィルター上の大腸菌をアルカリ変成、中和し、ストラタリンカー（ストラタジーン社）を用いてDNAをニトロセルロースフィルター上に固定した。さらにこのフィルターを減圧オープン中で 80°C で2時間加熱した。このように処理したニトロセルロースフィルターを、ヒトOCIFcDNAの5'末端と3'末端から作製した2種のDNAをプローブとしてハイブリダイズした。即ち、OCIFcDNAを含む大腸菌 pBK/OIF10（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所寄託、受託番号FERM BP-5267）よりプラスミドを精製し、OCIFcDNAを含むプラスミドを制限酵素KpnIとEcoRIで消化し、生ずるフラグメントをアガロスゲルを用いて分離したのち、0.2kbのKpnI/EcoRIフラグメントをQIAEX IIゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このDNAをメガプライムDNAラベリングシステム（アマシャム社製）を用いて ^{32}P で標識した（5'-DNAプローブ）。また別に、得られたプラスミドを制限酵素BamHIと制限酵素EcoRVで消化して生ずる0.2kbのBamHI/EcoRVフラグメントを同様に精製し、上記の方法で ^{32}P 標識した（3'-DNAプローブ）。上記レプリカフィルターのうち一枚を5'-DNAプローブと、別の一枚を3'-DNAプローブとハイブリダイズした。コロニーハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄はコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに述べられた方法に従っ

て行った。オートラジオグラフィーの結果それぞれのプローブで複数の陽性シグナルが検出されたが、両方のプローブにハイブリダイズする陽性シグナルが一個検出された。このシグナルに相当するアガロースプレート上のコロニーを精製することにより純化したコロニーを単離した。純化されたコロニーから常法に従ってコスミドを精製しpWEOCIF と命名した。このコスミドに含まれるヒトゲノムDNA のサイズはおよそ38kbであった。

【0016】

【実施例3】

ヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定

(i) OCIF ゲノムDNA のサブクローニング

コスミドpWEOCIF を制限酵素EcoRI を用いて消化し、生じたフラグメントを0.7%アガロースゲルに供与して分離したのち、サザンブロット法によってDNA をナイロン膜 (Hybond-N、アマシャム社) に移し、ストラタリンカー (ストラタジーン社) を用いてDNA をナイロン膜に固定した。一方、プラスミドpBKOCIF を制限酵素EcoRI によって消化し、ヒトOCIFcDNAを含む1.6kb のフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム社) を用いて³²P 標識した。常法に従って上記ナイロン膜と³²P 標識した1.6kb のOCIFcDNAをハイブリダイズさせた結果、6kb、4kb、3.6kb、2.6kb のDNA フラグメントがハイブリダイズすることがわかった。ヒトOCIFcDNAとハイブリダイズするこれらのフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、それぞれpBluescript II SK+ベクター (ストラタジーン社) のEcoRI サイトに常法に従ってサブクローニングし、得られたプラスミドをそれぞれpBSE6、pBSE4、pBSE3.6、pBSE2.6 と命名した。

【0017】

(ii) 塩基配列の決定

上記プラスミドにサブクローニングされたヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定にはABI ダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングレディリーアクションキット (パーキンエルマー社) と373 シーケンシングシステム (アプライドバイオシステムズ社) を使用した。塩基配列決定用プライマーはヒトOCIF

cDNAの塩基配列（配列表配列番号4）をもとに合成した。また、塩基配列が決定された部分をもとにしてさらにプライマーを合成した。決定された塩基配列を配列表配列番号1及び2に示す。配列番号1にはOCIF遺伝子の第1エクソンが含まれ、配列番号2には第2、第3、第4、第5エクソンが含まれる。第1エクソンと第2エクソンの間にはおよそ17kbのヌクレオチドが介在する。

【0018】

【実施例3】

COS-7細胞による組み換え型OCIFの生産

(i) OCIFゲノムDNA発現コスミドの作製

OCIFゲノムDNAを動物細胞で発現させるために、コスミドベクターpWE15(ストラタジーン社)に発現プラスミドpcDL-SR α 296(Molecular and Cellular Biology, vol.8, p466-472, 1988)の発現ユニットを挿入した。まず、発現プラスミドpcDL-SR α 296 を制限酵素SalIで消化してSR α プロモーター、SV40後期スプライス信号、ポリ(A)付加信号などを含む約1.7kbの発現ユニットを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、コスミドベクターpWE15 を制限酵素EcoRIで消化し、アガロース電気泳動によって分離後、8.2kbのpWE15 DNAをQIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。これら二つのDNA断片末端をDNAブランディングキット(宝酒造社)を用いて平滑化し、DNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いて結合させ、大腸菌DH5 α (ギブコBRL社)に導入した。得られた形質転換株を増殖させ、発現ユニットを含む発現コスミドpWESR α をキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。

【0019】

前記(i)で得られた約38kbのOCIFゲノムDNAが挿入されたコスミドpWE0CIFを制限酵素NotIで消化して約38kbのOCIFゲノムDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、発現コスミドpWESR α を制限酵素EcoRIで消化し、フェノール、クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿し、TEに溶解した。この制限酵素EcoRIで消化されたpWESR α とEcoRI-XmnI-NotIアダプター(#1105、#1

156 ; ニューイングランドバイオラボ社) をT4 DNAリガーゼ (宝酒造社) を用いて結合し、アガロース電気泳動によってフリーのアダプターと分離後、QIAEX II ゲルエクストラクションキット (キアゲン社) を用いて精製した。制限酵素NotI で消化された約37kbのOCIFゲノムDNAとアダプターを付加したpWESR α をT4 DNAリガーゼ (宝酒造社) を用いて結合し、ギガパックIIパッケージングエクストラクト (ストラータジーン社) を用いてインヴィトロパッケージングを行い、大腸菌XL1-Blue MR (ストラータジーン社) に感染させた。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFゲノムDNAが挿入された発現コスミドpWESR α OCIFをキアゲンカラム (キアゲン社) を用いて精製した。OCIF発現コスミドpWESR α OCIFをエタノールによって沈澱させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

【0020】

(ii)OCIFゲノムDNAのトランジェントな発現及びOCIF活性の測定

前記(i) で得られたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換え型OCIFを発現させ、その活性を測定した。 8×10^5 個のCOS-7 細胞 (理化学研究所細胞開発銀行、RCB0539) を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清 (ギブコBRL社) を含むDMEM培地 (ギブコBRL社) を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン (ギブコBRL社) 添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地 (ギブコBRL社) を用いて希釈しておいたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。対照として発現コスミドpWESR α を用い、細胞に同様に加えた。用いたコスミドDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3 μ g 及び12 μ l であった。24時間後、培地を除き1.5ml の新しいEX-CELL301培地 (JRH バイオサイエンス社) を加え、さらに48時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は久米川正好らの方法 (蛋白質・核酸・酵素 Vol.34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et.alの方法 (Endocrinology vol.122, p1373 (1988)) に従い測定した。生後約17日のマウス骨髓細胞からの活性型ビタミンD₃ 存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質 (

OCIF) の活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、 2×10^{-8} Mの活性型ビタミンD₃ と10%牛胎児血清を含む α -MEM培地（ギブコBRL社）で希釈したサンプル 100 μ l を入れ、生後約17日のマウス骨髓細胞 3×10^5 個を 100 μ l の10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO₂、37℃、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液のうち 160 μ l を廃棄し、 1×10^{-8} M活性型ビタミンD₃ 及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地で希釈したサンプル 160 μ l を添加した。培養7日後に細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン（1：1）溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット（Acid Phosphatase, Leucocyte, Cat.No.387-A；シグマ社）を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。結果を表1に示す。この結果より、IMR-90の培養液から得られた天然型OCIF及びCHO細胞で生産した組み換え型OCIFと同様の活性を、この培養液が有することが確認された。

【0021】

【表1】

COS-7細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
OCIF genomic DNA導入	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

【0022】

(iii)ウエスタンブロッティングによる生産物の確認

上記(ii)で得られたOCIF活性測定用サンプルを10 μ l 取り、10 μ l のSDS-PAGE用サンプルバッファー (0.5M Tris-HCl、20% グリセロール、4% SDS、20 μ g/mlブロムフェノールブルー、pH 6.8) を加えて100℃で3分間煮沸したのち、非還元状態で10%SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、セミドライブロッティング装置 (バイオラッド社) を用いて蛋白質をゲルからPVDFメンブレン (ProBlott、パーキンエルマー社) にブロッティングした。そのメンブレンをブロッティング後、先に得られたOCIF蛋白質を西洋ワサビパーオキシダーゼで常法により標識した西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに37℃で2時間保温した。洗浄後、ECL システム (アマシャム社) を用いて抗OCIF抗体が結合している蛋白質を検出した。図1に示すようにpWESR α OCIFをトランスフェクトした COS-7細胞の培養上清からは、分子量約 120キロダルトンと60キロダルトンの2本のバンドが検出された。一方、pWESR α ベクターのみをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清を同様の方法で解析した結果、120キロダルトンと60キロダルトンのバンドは検出されなかった。この結果より、得られた蛋白質はOCIFであることが確認された。

【0023】

【発明の効果】

本発明によると破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法が提供される。本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

【0024】

配列番号：1

配列の長さ：1316

配列の型：核酸

鎖の数：2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-1)

配列：

```

CTGGAGACAT ATAACTTGAA CACTTGCCCC TGATGGGGAA GCAGCTCTGC AGGGACTTTT 60
TCAGCCATCT GTAAACAATT TCAGTGGCAA CCCGCGAACT GTAATCCATG AATGGGACCA 120
CACTTTACAA GTCATCAAGT CTAAGTTCTA GACCAGGGAA TTAATGGGGG AGACAGCGAA 180
CCCTAGAGCA AAGTGCCAAA CTTCTGTCGA TAGCTTGAGG CTAGTGGAAA GACCTCGAGG 240
AGGCTACTCC AGAAGTTCAG CGCGTAGGAA GCTCCGATAC CAATAGCCCT TTGATGATGG 300
TGGGGTTGGT GAAGGGAACA GTGCTCCGCA AGGTTATCCC TGCCCCAGGC AGTCCAATTT 360
TCACTCTGCA GATTCTCTCT GGCTCTAACT ACCCCAGATA ACAAGGAGTG AATGCAGAAT 420
AGCACGGGCT TTAGGGCCAA TCAGACATTA GTTAGAAAAA TTCCTACTAC ATGGTTTATG 480
TAAACTTGAA GATGAATGAT TGCGAACTCC CCGAAAAGGG CTCAGACAAT GCCATGCATA 540
AAGAGGGGCC CTGTAATTTG AGGTTTCAGA ACCCGAAGTG AAGGGGTCAG GCAGCCGGGT 600
ACGGCGGAAA CTCACAGCTT TCGCCCAGCG AGAGGACAAA GGTCTGGGAC AACTCCAAC 660
TGCGTCCGGA TCTTGGCTGG ATCGGACTCT CAGGGTGGAG GAGACACAAG CACAGCAGCT 720
GCCCAGCGTG TGCCCAGCCC TCCCACCGCT GGTCCCGGCT GCCAGGAGGC TGGCCGCTGG 780
CGGGAAGGGG CCGGGAACC TCAGAGCCCC GCGGAGACAG CAGCCGCCTT GTTCCTCAGC 840
CCGGTGGCTT TTTTTCCTCC TGCTCTCCCA GGGGACAGAC ACCACCGCCC CACCCTCAC 900
GCCCCACCTC CCTGGGGGAT CCTTCCGCC CCAGCCCTGA AAGCGTTAAT CCTGGAGCTT 960
TCTGCACACC CCCCAGCCGC TCCCGCCCAA GCTTCCTAAA AAAGAAAGGT GCAAAGTTTG 1020
GTCCAGGATA GAAAAATGAC TGATCAAAGG CAGGCGATAC TTCCTGTTGC CGGGACGCTA 1080
TATATAACGT GATGAGCGCA CGGGCTGCGG AGACGCACCG GAGCGCTCGC CCAGCCGCCG 1140
CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CCGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193

```

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20

-15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GGCGCCTGGG 1242

Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GGCGGGGAGA AGGCTCCACT 1302

CGCTCCCTCC CAGG 1316

【0025】

配列番号：2

配列の長さ：9898

配列の型：核酸

鎖の数：2

トポロジー：直鎖状

配列の種類：genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-2)

配列：

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60

ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCCTTTC 120

TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171

Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe

-10

-5

1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219

Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu

5

10

15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267

Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala

20

25

30

35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC 315
Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp
40 45 50

AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG 363
Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
55 60 65

GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG 411
Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
70 75 80

TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA 459
Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
85 90 95

CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA 509
His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
100 105 110

ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAGGAGAA 569
CACTTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG 629
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC 689
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCAGCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG 749
ATGGTTTTTT TTTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT 809
ATACCTCTAT ATTTCACTTC AGCATGGACA CCTTCAAACCT GCAGCACTTT TTGACAAACA 869
TCAGAAATGT TAATTTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT 929
GCTAACAATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGGAATTGCA 989

TTTCATTATT AAAAACAAGG CTAGTTCTTC CTTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTTGGGAGG 1049
 GTAAGGACTA TAGCAGAATC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT 1109
 GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTTG CATTTTGAAC 1169
 AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTTTC 1229
 TGCCACATTT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACTTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA 1289
 GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTTGAAG 1349
 CAGTGTCTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG 1409
 ACTCCTTTTT GTGGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC 1469
 TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAAT GTCTTCAGAC 1529
 ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT 1589
 AAGTATCTGT AACTATTTTA ACTCTCAAAA CTTGTGATAT ACAAAGTCTA AATTATTAGA 1649
 CGACCAATAC TTTAGGTTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC 1709
 TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT 1769
 CCCTTAAAAAT TCCTCTTCGT ATGAGTATTT GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT 1829
 CTATTGGATG GACTTTTGAG ACTCAAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGCG 1889
 GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTGAGTA AGTTGTATAT 1949
 GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAACTAG AGAATTTTGA AAAATAATGG 2009
 AAATCACAAG GATCTTTCTT AAATAAGTAA GAAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG 2069
 GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT 2129
 GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTTCCTCTT GGGAAATAAG 2189
 AGGTTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGTT ACTCTAAAAA GTATTTAATA 2249
 ACCGTTTTGT TGTGCTGTT GCTGTTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT 2309
 TACTTCATTG TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGAA TTCTCAACTG 2369
 TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATTT CACATTTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTTA 2429
 TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTTCATAA 2489
 AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGGAAGTCAT GTTCATGTTT AGGAAGGTCA TTAGATAAAG 2549
 CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTTT GTTAAATAAC 2609
 TTAAAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAACCTCTC ATTAGGATGC 2669
 AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCGGC 2729

ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCGGGCA GATCACCTGA 2789
 GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC 2849
 AAAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC 2909
 AGGAGAATCT CTTGAACCCT CGAGGCGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA 2969
 CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC 3029
 AAAAAAGATTC TTCTTCATGC AGAACATACG GCAGTCAACA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG 3089
 TGTCCAAGTC ACTTATTTTCG AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCCC 3149
 AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCCA TTTAAGGAGT 3209
 AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCTC TTTGCTTTGT 3269
 AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTTAAT ATGTGAAGGT 3329
 TTTAGGCTGT GTTTTCCCCT CCTGTTCTTT TTTTCTGCCA GCCCTTTGTC ATTTTTCAG 3389
 GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAGTCCA TTTTGCCCT 3449
 TTTTTTATTT TCTGGTTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTTGAG ATTTATAAAT 3509
 GAAGTTTAAT AAGTTTCTGT AGCTTTGATT TTTCTCTTC ATATTTGTTA TCTTGCATAA 3569
 GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC 3629
 TTACTACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATACACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC 3689
 GTAATATAGT CAAGTGTTTG AAGGTATTTA TTTTAAATAG CGTCTTTAGT TGTGGACTGG 3749
 TTCAAGTTTT TCTGCCAATG ATTTCTTCAA ATTTATCAAA TATTTTCCCA TCATGAAGTA 3809
 AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTTT AAACAGTTTA 3869
 AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAGCTTAA CTGCAGGCTT ACGCTTTTGA 3929
 GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTACT 3989
 TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAGGAAA GAAAGAACTT 4049
 CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAGAAT 4109
 GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT 4169
 ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGACTAATGA ACACCCTACC 4229
 CTTCTTTCCT TTCCTCTCAC ATTTTCATGAG CGTTTTGTAG GTAACGAGAA AATTGACTTG 4289
 CATTTGCATT ACAAGGAGGA GAAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAGT TTTGTTCTGT 4349
 CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409
 CCAAGTGAAA AGTCTTTCCA AAAGTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGGAA ACGATTTGAG 4469

GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571

Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser

120

125

130

135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619

Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu

140

145

150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667

Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn

155

160

165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715

Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile

170

175

GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775

ACATTCTTGG TCAAACTTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835

CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAATCATCT TCTCACAGAT 4895

AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA TCAAATCTTG CCCATAGGCA 4955

AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015

CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075

TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC AGGCATGGTG GCTTACTCCT 5135

ATAATCCCAA CATTTTGGGG GGCCAAGGTA GGCAGATCAC TTGAGGTCAG GATTTCAGA 5195

CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT TAGCTGGGCA 5255

TGGTAGCAGG CACTTCTAGT ACCAGCTACT CAGGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 5315
 CAGGAGATGG AGGTTGCAGT GAGCTGAGAT TGTACCACTG CACTCCAGTC TGGGCAACAG 5375
 AGCAAGATTT CATCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACATTAGA AATGTGTACT 5435
 TGGCTTTGTT ACCTATGGTA TTAGTGCATC TATTGCATGG AACTTCCAAG CTACTCTGGT 5495
 TGTGTAAAGC TCTTCATTGG GTACAGGTCA CTAGTATTAA GTTCAGGTTA TTCGGATGCA 5555
 TTCCACGGTA GTGATGACAA TTCATCAGGC TAGTGTGTGT GTTCACCTTG TCACTCCAC 5615
 CACTAGACTA ATCTCAGACC TTCACTCAAA GACACATTAC ACTAAAGATG ATTTGCTTTT 5675
 TTGTGTTTAA TCAAGCAATG GTATAAACCA GCTTGACTCT CCCCCAACAG TTTTTCGTAC 5735
 TACAAAGAAG TTTATGAAGC AGAGAAATGT GAATTGATAT ATATATGAGA TTCTAACCCA 5795
 GTTCCAGCAT TGTTTCATTG TGTAATTGAA ATCATAGACA AGCCATTTTA GCCTTTGCTT 5855
 TCTTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAATGA AGGAAGGGGT ATTAAAAGGA GTGATCAAAT 5915
 TTTAACATTC TCTTTAATTA ATTCATTTTT AATTTTACTT TTTTTCATTT ATTGTGCACT 5975
 TACTATGTGG TACTGTGCTA TAGAGGCTTT AACATTTATA AAAACACTGT GAAAGTTGCT 6035
 TCAGATGAAT ATAGGTAGTA GAACGGCAGA ACTAGTATTC AAAGCCAGGT CTGATGAATC 6095
 CAAAAACAAA CACCCATTAC TCCCATTTTC TGGGACATAC TTA CTCTACC CAGATGCTCT 6155
 GGGCTTTGTA ATGCCTATGT AAATAACATA GTTTTATGTT TGGTTATTTT CCTATGTAAT 6215
 GTCTACTTAT ATATCTGTAT CTATCTCTTG CTTTGTTCCT AAAGGTAAAC TATGTGTCTA 6275
 AATGTGGGCA AAAAATAACA CACTATTCCA AATTACTGTT CAAATTCCTT TAAGTCAGTG 6335
 ATAATTATTT GTTTTGACAT TAATCATGAA GTTCCCTGTG GGTACTAGGT AAACCTTTAA 6395
 TAGAATGTTA ATGTTTGTAT TCATTATAAG AATTTTGGC TGTTACTTAT TTACAACAAT 6455
 ATTTCACTCT AATTAGACAT TTAATAAAT TTCTCTTGAA AACAATGCCC AAAAAAGAAC 6515
 ATTAGAAGAC ACGTAAGCTC AGTTGGTCTC TGCCACTAAG ACCAGCCAAC AGAAGCTTGA 6575
 TTTTATTCAA ACTTTGCATT TTAGCATATT TTATCTTGGA AAATTCAATT GTGTTGGTTT 6635
 TTTGTTTTTG TTTGTATTGA ATAGACTCTC AGAAATCCAA TTGTTGAGTA AATCTTCTGG 6695
 GTTTCTAAC CTTTCTTTAG AT GTT ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG 6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795

Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190

195

200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843

Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205

210

215

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220

225

230

235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240

245

250

GTATGATAAT CTAAAATAAA AAGATCAATC AGAAATCAAA GACACCTATT TATCATAAAC 7000

CAGGAACAAG ACTGCATGTA TGTTTAGTTG TGTGGATCTT GTTTCCTGT TGGAATCATT 7060

GTTGGACTGA AAAAGTTTCC ACCTGATAAT GTAGATGTGA TTCCACAAAC AGTTATACAA 7120

GGTTTTGTTC TCACCCCTGC TCCCCAGTTT CTTGTAAAG TATGTTGAAC ACTCTAAGAG 7180

AAGAGAAATG CATTTGAAGG CAGGGCTGTA TCTCAGGGAG TCGCTTCCAG ATCCCTTAAC 7240

GCTTCTGTAA GCAGCCCCTC TAGACCACCA AGGAGAAGCT CTATAACCAC TTTGTATCTT 7300

ACATTGCACC TCTACCAAGA AGCTCTGTTG TATTTACTTG GTAATTCTCT CCAGGTAGGC 7360

TTTTCGTAGC TTACAAATAT GTTCTTATTA ATCCTCATGA TATGGCCTGC ATTAATAATTA 7420

TTTTAATGGC ATATGTTATG AGAATTAATG AGATAAAATC TGAAAAGTGT TTGAGCCTCT 7480

TGTAGGAAAA AGCTAGTTAC AGCAAAATGT TCTCACATCT TATAAGTTTA TATAAAGATT 7540

CTCCTTTAGA AATGGTGTGA GAGAGAAACA GAGAGAGATA GGGAGAGAAG TGTGAAAGAA 7600

TCTGAAGAAA AGGAGTTTCA TCCAGTGTGG ACTGTAAGCT TTACGACACA TGATGGAAG 7660

AGTTCTGACT TCAGTAAGCA TTGGGAGGAC ATGCTAGAAG AAAAAGGAAG AAGAGTTTCC 7720

ATAATGCAGA CAGGGTCAGT GAGAAATTCA TTCAGGTCCT CACCAGTAGT TAAATGACTG 7780

TATAGTCTTG CACTACCCTA AAAAAGTTCA AGTATCTGAA ACCGGGGCAA CAGATTTTAG 7840
 GAGACCAACG TCTTTGAGAG CTGATTGCTT TTGCTTATGC AAAGAGTAAA CTTTTATGTT 7900
 TTGAGCAAAC CAAAAGTATT CTTTGAACGT ATAATTAGCC CTGAAGCCGA AAGAAAAGAG 7960
 AAAATCAGAG ACCGTTAGAA TTGGAAGCAA CCAAATCCC TATTTTATAA ATGAGGACAT 8020
 TTTAACCAG AAAGATGAAC CGATTGGCT TAGGGCTCAC AGATACTAAG TGAATCATGT 8080
 CATTAATAGA AATGTAGTT CCTCCCTCTT AGGTTGTAC CCTAGCTTAT TACTGAAATA 8140
 TTCTCTAGGC TGTGTGTCTC CTTTAGTTCC TCGACCTCAT GTCTTTGAGT TTTCAGATAT 8200
 CCTCCTCATG GAGGTAGTCC TCTGGTGCTA TGTGTATTCT TTAAAGGCTA GTTACGGCAA 8260
 TTAAGTTATC AACTAGCGCC TACTAATGAA ACTTTGTATT ACAAAGTAGC TAACTTGAAT 8320
 ACTTTCTTT TTTTCTGAAA TGTTATGGTG GTAATTTCTC AAAGTTTTC TTAGAAAACT 8380
 GAGAGTGATG TGTCTTATTT TCTACTGTTA ATTTTCAAAA TTAGGAGCTT CTTCCAAAGT 8440
 TTTGTTGGAT GCCAAAAATA TATAGCATAT TATCTTATTA TAACAAAAAA TATTTATCTC 8500
 AGTTCTTAGA AATAAATGGT GTCACTTAAC TCCCTCTCAA AAGAAAAGGT TATCATTGAA 8560
 ATATAATTAT GAAATTCTGC AAGAACCCTT TGCCTCACGC TTGTTTTATG ATGGCATTGG 8620
 ATGAATATAA ATGATGTGAA CACTTATCTG GGCTTTTGCT TTATGCAG AT ATT GAC 8676

Asp Ile Asp

CTC TGT GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC 8724
 Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr
 255 260 265 270

TTC GAG CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG 8772
 Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val
 275 280 285

GGA GCA GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC 8820
 Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp
 290 295 300

CAG ATC CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA 8868
Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln

305

310

315

GAC ACC TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC 8916
Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr

320

325

330

CAC TTT CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC 8964
His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe

335

340

345

350

CTT CAC AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA 9012
Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu

355

360

365

ATG ATA GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA 9054
Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

370

375

380

TAAC TGGA AAA TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA 9114
ACTGTTTCTC AGGCACTTGA GGCTTTCAGT GATATCTTTC TCATTACCAG TGAATAATTT 9174
TGCCACAGGG TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA 9234
ACCCCAAATG GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTTCCC 9294
TTATTACTGC TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTA AAAAAA AAAAACTAGA CTCCACTGGG 9354
CCTTACTAAA TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTTGG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG 9414
CTTTTATTAG AAAGCCATAT TTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT 9474
ACAGTATTGC TATTTATATT CATTAGATA TAAGATTGG ACATATTATC ATCCTATAAA 9534
GAAACGGTAT GACTTAATTT TAGAAAGAAA ATTATATTCT GTTTATTATG ACAAATGAAA 9594

GAGAAAATAT ATATTTTAA TGGAAAGTTT GTAGCATTTT TCTAATAGGT ACTGCCATAT 9654
 TTTTCTGTGT GGAGTATTTT TATAATTTTA TCTGTATAAG CTGTAATATC ATTTTATAGA 9714
 AAATGCATTA TTTAGTCAAT TGTTTAATGT TGGAAAACAT ATGAAATATA AATTATCTGA 9774
 ATATTAGATG CTCTGAGAAA TTGAATGTAC CTTATTTAAA AGATTTTATG GTTTTATAAC 9834
 TATATAAATG ACATTATTAA AGTTTTCAAA TTATTTTSTA TTGCTTTCTC TGTTGCTTTT 9894
 ATTT 9898

【0026】

配列番号：3

配列の長さ：401

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列：

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					1					5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				
Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu
55					60					65				
Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys
70					75					80				

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
 85 90 95
 His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr
 100 105 110
 Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe
 115 120 125
 Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn
 130 135 140
 Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr
 145 150 155
 His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys
 160 165 170
 Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala
 175 180 185
 Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp
 190 195 200
 Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 205 210 215
 Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys
 220 225 230
 Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile
 235 240 245
 Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile
 250 255 260
 Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu
 265 270 275
 Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr
 280 285 290
 Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser

295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

【0027】

配列番号：4

配列の長さ：1206

配列の型：核酸

鎖の数：1

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列：

```

ATGAACAAC TGTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCAGAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540

```

CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
 CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
 AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
 AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
 AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
 GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
 AGCTTACCGG GAAAGAAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
 CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
 ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAAACT 1080
 GTCCTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
 TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
 TTATAA 1206

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例3(iii)における、本発明ゲノムDNAを発現して得られた蛋白質の、ウエスタンブロッティングの結果を示す。

【符号の説明】

1 : マーカー

2 : ベクターpWESR α OCIFをトランスフェクトした COS7 細胞培養上清 (実施例3(iii))

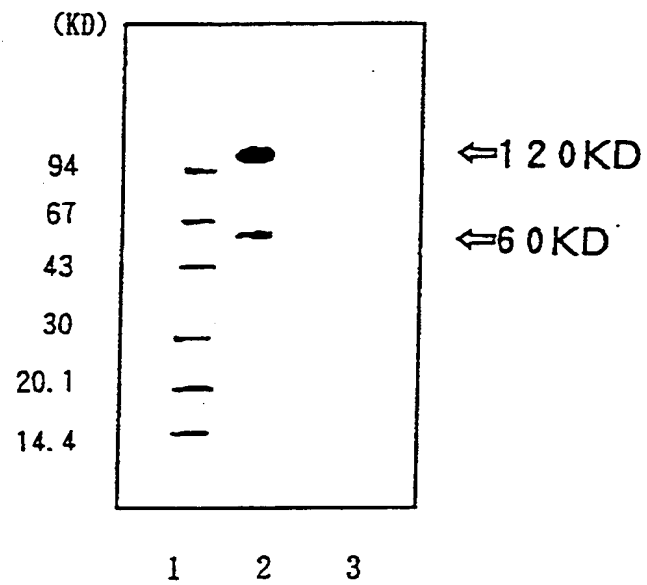
3 : ベクターpWESR α をトランスフェクトした COS7 細胞培養上清 (対照)

特平 8-235928

【書類名】

図面

【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質をコードする新規DNA及びそれを用いる該蛋白質の製造法。

【解決手段】 配列表1及び2で示されるDNA。

該DNAを発現ベクターに挿入し、遺伝子工学的手法によって分子量約60kD（還元条件下）の約60kD及び約120kD（非還元条件下）の破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質を製造する方法。

この蛋白質は、破骨細胞形成抑制作用を有し、骨粗鬆症、リウマチ症の治療に有用である。

【選択図】 なし

特平 8-235928

国際様式 INTERNATIONAL FORM

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7. 1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名 (名称) 雪印乳業株式会社 生物科学研究所
所長 竹下 保義

寄託者

あて名 ③ 329-05
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林
519 等地

殿

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) pBK/01F10	(受託番号) FERM BP- 5267
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 7 年 6 月 21 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 7 年 6 月 21 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。 そして、平成 7 年 10 月 25 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 7 年 6 月 21 日に寄託された菌工研菌第 P- 14998 号より移管)	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Human-Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 大石 道夫 Michio Ohsaka, D. DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本田茨園 1-3 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 7 年 (1995) 10 月 25 日	

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 000006699
【住所又は居所】 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社
【代理人】 申請人
【識別番号】 100090941
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階
藤野・児玉特許事務所
【氏名又は名称】 藤野 清也
【代理人】 申請人
【識別番号】 100105061
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階
藤野・児玉特許事務所
【氏名又は名称】 児玉 喜博
【提出された物件の記事】
【提出物件名】 原寄託についての受託証 1

特平 8-235928

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏 名 雪印乳業株式会社